论著

文章编号:1000-5404(2012)14-1434-04

牡丹皮抗内毒素活性研究

陈益国[1,2],曹红卫[1],王 宁[1],郑 江[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院综合实验研究中心[1];330006 南昌,江西省人民医院检验科[2])

[摘要] **目的** 对传统中药牡丹皮(*Paeonia suffruticosa Andr*, PSA)抗内毒素(LPS)活性组分进行定向分离及体内外活性评价。**方法** 利用生物传感器、硅胶柱层析、聚酰胺层析、离子交换-HPLC 等技术对牡丹皮进行活性组分的定向分离。通过活性组分对 LPS 介导 RAW264.7 分泌细胞因子的抑制实验、对 LPS 和热灭活大肠杆菌攻击小鼠的保护实验,评价所得活性组分对内毒素的拮抗作用。**结果** 从牡丹皮水提取物中分离到一个与 Lipid A 具有较高结合活性的组分(PSA-3),PSA-3 在体外能抑制 LPS 介导的 RAW264.7 细胞释放 TNF-α($P_{45\ \mu g}<0.05$, $P_{90,180\ \mu g}<0.01$),对致死剂量 LPS 攻击小鼠的保护率为 50%($P<0.01$),对致死剂量热灭活大肠杆菌攻击小鼠的保护率为 50%($P<0.05$),而低结合活性 PSA-1 组分则不具有抑制作用,对 LPS 和热灭活大肠杆菌(HK-*E. coli*)攻击小鼠也无保护效果。**结论** 从牡丹皮中分离到一个与 Lipid A 具有较高结合活性的组分,该组分在体内外对 LPS 均具有一定的拮抗作用。

[关键词] 生物传感器;内毒素;牡丹皮;脓毒症

[中图法分类号] R282.71;R285.5;R364.5 [文献标志码] A

Antiendotoxin bioactivities of *Paeonia suffruticosa Andr*

Chen Yiguo[1,2], Cao Hongwei[1], Wang Ning[1], Zheng Jiang[1] ([1]General Experimental Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Clinical Laboratory, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang, Jiangxi Province, 330006, China)

[**Abstract**] **Objective** To isolate the antiendotoxin active components (LPS) from *Paeonia suffruticosa Andr* (PSA) using biosensor and purification technology and assess their bioactivities *in vitro* and *in vivo*. **Methods** LPS were isolated from PSA using biosensor, silica gel column chromatography, polyamide chromatography, and IEC-HPLC. Inhibitory effect of LPS on antiendotoxin-mediated secretion of cytokines from RAW264.7 and protective effect of LPS on mice against antiendotoxin and heat killed *E. coli* (HK-*E. coli*) were studied. **Results** PSA-3, an antiendotoxin active component with a high binding activity to lipid A, isolated from PSA, could inhibit TNF-α release from LPS-mediated RAW264.7 ($P_{45\ \mu g}<0.05$, $P_{90,180\ \mu g}<0.01$). The protective efficiency of PSA-3 on mice was 50% against lethal LPS dose ($P<0.01$) and lethal HK-*E. coli* dose, respectively ($P<0.05$). PSA-1 with a lower binding activity to lipid A had no inhibitory and protective effect on mice against LPS and HK-*E. coli*. **Conclusion** PSA-3, a component isolated from PSA, has a high binding activity to lipid A and an antagonistic effect on LPS both *in vivo* and *in vitro*.

[**Key words**] affinity biosensor; lipopolysaccharide; *Paeonia suffruticosa Andr*; sepsis

Corresponding author: Zheng Jiang, Tel:86-23-68754435, E-mail: zhengj99219@gmail.com

牡丹皮(*Paeonia suffruticosa Andr*,PSA)又名木芍药、丹皮、花王,为植物毛茛科牡丹的根皮。近年来研究[1-3]表明,牡丹皮对金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、绿脓杆菌、炭疽杆菌、变形杆菌、甲型链球菌、乙型链球菌等多种细菌均有明显的抑菌作用。由于牡丹皮化学组成较为复杂,丹皮和丹皮根中含有多种化学成分,其发挥抗菌作用的主要物质尚未明确。本研究利用生物传感器跟踪检测体系,采用萃取、硅胶柱层析、聚酰胺层析、阳离子交换-HPLC 色谱等技术定向分离牡丹皮水提物中与脂质 A(Lipid A)高结合活性的组分;通过细胞培养技术,观察其对内毒素刺激的小鼠巨噬细胞系(RAW264.7)释放细胞因子 TNF-α 的抑制作用;体内观察其有效成分对小鼠内毒素(LPS)血症模型动物以及致死剂量热灭活大肠杆菌攻击小鼠的保护作用。

[通信作者] 郑 江,电话:(023)68754435,E-mail: zhengj99219@gmail.com

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂和仪器

牡丹皮生药购于沙坪坝大药房,昆明系 SPF 小鼠,体质量 18~22 g,购于第三军医大学实验动物中心;小鼠巨噬细胞

RAW264.7 购自美国 ATCC 公司；大肠杆菌（*E. coli*）标准株 ATCC25922 为本中心保存；LPS O111：B4（批号 043K4112）为 Sigma 公司产品；硅胶及聚酰胺树脂购于天津海光化工有限公司；SPFF 阳离子交换树脂购于瑞典安莫西亚公司；AKTA Explorer 100 HPLC 为瑞典安莫西亚公司产品；小鼠肿瘤坏死因子-α（TNF-α）ELISA 试剂盒购于深圳晶美生物有限公司。生物传感器及其生物素样品池、CO_2 培养箱、Savant 离心浓缩冻干机为美国 Thermo 公司产品；Model 550 酶联分析仪为美国 Bio-Rad 公司产品；其余常规试剂均市购。

1.2 方法

1.2.1 牡丹皮有效组分 PSA-3 的制备 ①取 1 kg 牡丹皮粉碎，100 ℃回流提取，加入过量明胶，50 ℃水浴 3 h 去除鞣质沉淀，将上清液旋转蒸干，用丙酮复溶后过滤去除沉淀。②将处理好的样品进行硅胶柱层析，用丙酮、丙酮-乙醇（3∶7）、乙醇、1% 醋酸-乙醇等度洗脱，分别收集各组分，重复 10 次循环；将硅胶柱层析后所得各组分按文献[4]测定其与 Lipid A 结合反应值（respond unity，RU）。③聚酰胺层析，按厂家要求将聚酰胺装柱活化，取牡丹皮硅胶柱层析后高结合组分，0.45 μm 滤膜过滤后上样，用双蒸水、无水乙醇、1% 氨水洗脱，收集各组分按②测定所得组分与 Lipid A 的结合反应值。④按 HPLC 操作程序进行色谱参数设置及阳离子交换树脂的活化；将牡丹皮聚酰胺层析后高结合活性组分 0.22 μm 滤膜过滤上样，洗脱相为双蒸水和氨水乙醇（1% $NH_3 \cdot H_2O$ + 1% ETOH），收集各洗脱液，即上样液（PSA-1），双蒸水洗脱液（PSA-2）和氨水乙醇洗脱液（PSA-3），收集时去除刚出峰和拖尾部分，共上样 10 次；将所得组分配制成 10 μg/ml，测定与 Lipid A 的结合反应值。

1.2.2 PSA-3 对 LPS 刺激的 RAW264.7 分泌细胞因子的抑制作用 用 DMEM 培养液将 RAW264.7 细胞数稀释为 1×10^6/ml，按 0.2 ml/孔转入 96 孔细胞培养板，37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养 4 h；更换培养基后按下述分组加样：LPS 组（100 ng/ml），PSA-3（45、90、180 μg/ml）+ LPS 组，PSA-3 组（180 μg/ml），PSA-1（20、40、80 μg/ml）+ LPS 组，PSA-1 组（80 μg/ml），PMB（10 μg/ml）+ LPS 组，空白对照组（PBS）；加样后继续培养 4 h，水平离心取上清后按 ELISA 试剂盒说明书进行 TNF-α 测定。

1.2.3 牡丹皮活性组分对 LPS 攻击小鼠的保护作用 SPF 级昆明小鼠 40 只，雌雄各半，分为 LPS 攻击组、LPS 攻击后 PSA-1、PSA-3 治疗组，各 10 只，PSA-1、PSA-3 对照组各 5 只；以尾静脉注射攻击小鼠，观察 PSA-3 组分对 LPS 攻击小鼠死亡的保护作用；注射剂量为 PSA-3 100 mg/kg，LPS 18 mg/kg；所有小鼠均按 300 μl 注射，不足的用生理盐水补充；记录小鼠 72 h 存活情况；前 24 h 每 6 小时观察 1 次，以后 12 h 观察 1 次。

1.2.4 牡丹皮对热灭活大肠杆菌攻击小鼠的保护作用 SPF 级昆明小鼠 40 只，雌雄各半，分为大肠杆菌攻击组、大肠杆菌攻击后 PSA-3 及 PSA-1 治疗组，每组 10 只，PSA-1、PSA-3 对照组各 5 只；以尾静脉注射攻击小鼠，观察 PSA-3 对致死剂量热灭活大肠杆菌攻击小鼠保护作用；注射剂量：牡丹皮组分均为 100 mg/kg，大肠杆菌攻击剂量：6.0×10^9 CFU/kg；所有小鼠均按 300 μl 体积注射，不足的用生理盐水补充；记录小鼠 72 h存活情况；前 24 h 每6 小时观察 1 次，以后 12 h 观察 1 次。

1.2.5 统计学处理 使用 SPSS 11.0 统计软件进行分析，用 Excel 2003 进行作图，TNF-α 均数间比较用 t 检验；LPS、大肠杆菌攻击后 PSA-3 治疗组与其相应的 PSA-3 未治疗组间比较用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 牡丹皮离子交换层析后各组分与 Lipid A 结合活性

牡丹皮聚酰胺层析后与 Lipid A 高结合组分经 SPFF 阳离子交换色谱后得到 3 个组分，即 PSA-1（上样峰）、PSA-2（水洗脱峰）、PSA-3（1% $NH_3 \cdot H_2O$ + 1% ETOH 洗脱峰）。3 个组分与 Lipid A 结合反应显示，PSA-3 与 Lipid A 结合活性最高为 531RU，第 2 组分（PSA-2）活性最低为 96RU，PSA-1 为 143RU，其分离结果如图 1。

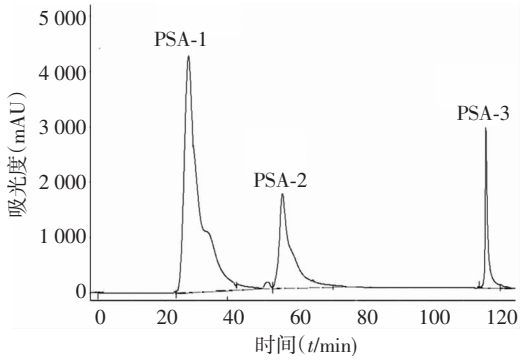
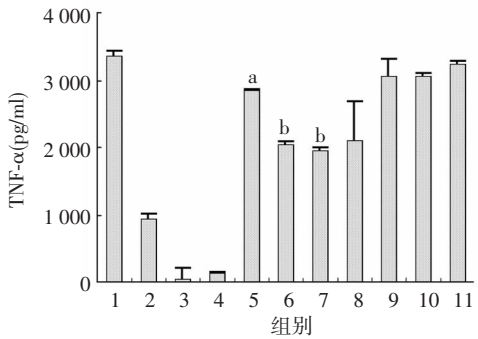


图 1 牡丹皮离子交换-HPLC 色谱分析

2.2 PSA-3 对 LPS 诱导 RAW264.7 释放 TNF-α 的抑制作用

牡丹皮活性组分对 LPS 刺激的 RAW264.7 分泌细胞因子的抑制实验表明，PSA-3 组分并不能刺激 RAW264.7 分泌细胞因子，不同剂量组（45、90、180 μg）的 PSA-3 对 LPS 刺激的 RAW264.7 产生的 TNF-α 具有显著抑制作用（$P_{45\ \mu g} < 0.05$，$P_{90,180\ \mu g} < 0.01$）；PSA-1 对 RAW264.7 具有刺激作用，其治疗组对 TNF-α 分泌抑制无统计学差异（$P > 0.05$）。见图 2。



a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与 LPS 组比较

1：LPS（100 ng）组；2：LPS + PMB 组；3：PSA-3（180 μg）组；4：培养基组；5：LPS + PSA-3（45 μg）组；6：LPS + PSA-3（90 μg）组；7：LPS + PSA-3（180 μg）组；8：PSA-1（80 μg）组；9：LPS + PSA-1（20 μg）组；10：LPS + PSA-1（40 μg）组；11：LPS + PSA-1（80 μg）组

图 2 牡丹皮组分对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 的抑制作用

2.3 PSA-3 组分对 LPS 攻击小鼠的保护作用

牡丹皮对 LPS 攻击小鼠保护实验表明,PSA-3 保护组 24 h 后已无动物死亡,其 72 h 保护效果为 50%,与对照组比较具有显著差异($P<0.01$);而与 Lipid A 低结合力 PSA-1 组分对小鼠的死亡无保护和推迟作用;经过反复动物实验证明,PSA-3 对 LPS 攻击的小鼠保护作用均稳定在 40% ~50%,见表 1。

表 1 PSA 组分对 LPS 攻击小鼠的保护实验($n=10$)

组别	小鼠存活数								生存率
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	36 h	48 h	72 h	(%)
LPS 组	10	7	5	3	3	1	1	1	10
PSA-1 + LPS 组	10	9	6	2	2	1	1	1	10
PSA-3 + LPS 组	10	9	8	7[a]	5	5[a]	5[a]	5[a]	50
PSA-3 组	5	5	5	5	5	5	5	5	100
PSA-1 组	5	5	5	5	5	5	5	5	100

a: $P<0.01$,与 LPS 组比较

2.4 PSA-3 对热灭活大肠杆菌攻击小鼠的保护作用

牡丹皮对热灭活大肠杆菌(ATCC25922,HK-*E. coli*)攻击小鼠保护实验表明,单纯大肠杆菌(6.0×10^9CFU/kg)攻击的小鼠在 72 h 内的死亡率为 80%,PSA-3 保护组 14 h 已无动物死亡,对小鼠 72 h 保护效果为 50%,对热灭活大肠杆菌攻击的小鼠具有保护作用($P<0.05$);而 PSA-1 组分对小鼠的死亡则无保护效果,也无推迟作用,见表 2。

表 2 PSA-3 对热灭活大肠杆菌攻击小鼠保护作用($n=10$)

组别	小鼠存活数											生存率
	0 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h	18 h	24 h	72 h	(%)
E. coli 组	10	7	6	4	3	3	3	3	3	2	2	20
PSA-3 组	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
PSA-1 组	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
PSA-1 + *E. coli* 组	10	9	8	7	7	6	3	3	1	1	1	10
PSA-3 + *E. coli* 组	10	10	8	8	6	6	5	5	5	5[a]	5[a]	50

a: $P<0.05$,与 *E. coli* 组比较

3 讨论

牡丹皮作为具有多种药理活性的传统中药,近年来逐渐引起了医药界重视。研究[1-3,5]表明,牡丹皮煎剂对多种细菌均具有抑制和杀菌作用,但牡丹皮是否具有拮抗内毒素引起的炎症反应,国内外尚少见文献报道。本课题在本室前期实验[6-7]的基础上,利用本实验室建立生物传感器跟踪平台,定向分离与 Lipid A 具有较高结合活性的牡丹皮组分并进行了体内外活性评价。

Lipid A 是 LPS 的活性中心,为两性基团,其含长链脂肪酸一端具有较强的疏水性,亲水端为含有大量负电荷的磷酸基团,体内外实验研究表明,Lipid A 的毒性与磷酸带电荷的多少密切相关,寻找能与 Lipid A 相结合的阳离子物质,是寻找脓毒症拮抗措施的方法之一[8-9]。我们首选了常规的硅胶柱层析和聚酰胺层析对牡丹皮抗内毒素成分初步分离,最后选择了90 μm SPFF-强阳离子交换填料进行分离制备,牡丹皮聚酰胺层析后活性组分经阳离子交换后得到 3 个组分即 PSA-1、PSA-2 和 PSA-3,与 Lipid A 结合检测结果表明,其主要活性成分存在于 PSA 的阳离子-PSA-3 组分,结果提示,PSA-3 可能具有中和 LPS 的潜能,体外鲎试剂动态浊度法表明,所得组分本身能引起鲎变形细胞的凝聚从而可能导致假阴性结果。因此选择 PSA-3 去除有机溶剂后进行抗内毒素体外和体内生物学活性初步评价,取其中低结合力的 PSA-1 作对照,以验证本文中所用生物传感器筛选平台的可靠性。

进入血液的 LPS,与血中内毒素结合蛋白(LBP)结合后,被单核巨噬细胞表面的 CD14 分子识别,激活一系列信号分子,引起单核细胞的活化,释放 TNF-α 和 IL-6 等细胞因子,介导脓毒症的发生[10],其中 TNF-α 被认为是在 LPS 休克病程中最早释放且起关键作用的介质。研究[11]表明,TNF-α、IL-6 和 LPS 的检出水平与病情及预后密切相关。我们的结果表明,与 Lipid A 有高结合力的牡丹皮活性组分 PSA-3 能显著抑制 LPS 刺激的 RAW264.7 分泌 TNF-α 的能力,而与 Lipid A 低结合力的 PSA-1 组分,自身能激活 RAW264.7 细胞,对 LPS 活化的 RAW264.7 无显著抑制作用;上述结果提示利用 Lipid A 为拮抗 LPS 活性成分跟踪分离靶点,具有可靠性和一致性,因此我们以 PSA-1 为阴性对照,对 PSA-3 进行体内活性评价。

LPS 是引起脓毒症的重要病原分子[12],是 G^- 细菌外膜的组成成分之一,对细菌的生长代谢和稳定都具有重要作用,也是 G^- 细菌的主要致病因子。因此,通过中和 LPS 的活性[13-14],从而阻断 LPS 与 LPB、CD14 的结合,抑制巨噬细胞、血管内皮细胞和补体等系统的活化,是治疗和预防由革兰阴性细菌引起的脓毒症的重要手段之一。本课题通过对牡丹皮活性组分的跟踪分离,得到一个与 Lipid A 具有较高亲结合活性的组分 PSA-3,对致死剂量 LPS 攻击小鼠的保护实验提示,PSA-3 能明显降低动物的死亡率,能明显推迟小鼠死亡时间;对热灭活大肠杆菌攻击的小鼠也具有明显保护作用;经过反复动物实验证明,PSA-3 对 LPS 和热灭活大肠杆菌攻击的小鼠的保护作用均稳定在 40% ~50%,保护效果明显,因此该组分具有进一步研究的价值。

参考文献:

[1] 傅若秋, 孟德胜, 胡大强, 等. 牡丹皮水提取物及乙醇提取物的抗菌作用研究[J]. 中国药业, 2010, 19(18): 29.

[2] 杜凡, 李惠芬, 王宇歆, 等. 牡丹皮中丹皮酚、总苷、多糖单用及合

用后的协同抑菌作用考查[J]. 天津药学, 2008, 20(2): 10-12.
[3] 宫毓静, 刘红, 冯淑怡, 等. 牡丹皮等10种中药对白色念珠菌浮游菌和生物膜作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 129-132.
[4] 陈益国, 姚婕, 张向武, 等. 以Lipid A为靶点拮抗内毒素中药的筛选[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(12): 1349-1353.
[5] 王宇歆, 李惠芬, 周静, 等. 大血藤、牡丹皮、赤芍有效组分间对肠道致病菌体外抑菌的协同作用[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2008, 14(4): 410-413.
[6] Genfa L, Jiang Z, Hong Z, *et al*. The screening and isolation of an effective anti-endotoxin monomer from Radix Paeoniae Rubra using affinity biosensor technology[J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(6): 1007-1017.
[7] Yao J, Zheng J S, Fu W, *et al*. Extraction of the anti-sepsis component from Terminaliachebula Retz and evaluation of its biological activities[J]. Biosci Rep, 2009, 30(1): 27-32.
[8] Yibin G, Jiang Z, Hong Z, *et al*. A synthesized cationic tetradecapeptide from hornet venom kills bacteria and neutralizes lipopolysaccharide *in vivo* and *in vitro*[J]. Biochem Pharmacol, 2005, 70(2): 209-219.
[9] Jiang Z, Hong Z, Guo W, *et al*. A synthetic peptide derived from bactericidal/permeability-increasing protein neutralizes endotoxin *in vitro* and *in vivo*[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(4): 527-537.
[10] Ventetuolo C E, Levy M M. Biomarkers: diagnosis and risk assessment in sepsis[J]. Clin Chest Med, 2008, 29(4): 591-603, vii.
[11] Ribas V J, Vellido A, Ruiz-Rodriguez J C, *et al*. Severe sepsis mortality prediction with logistic regression over latent factors[J]. Expert Syst Appl, 2012, 39(2): 1937-1943.
[12] Li J, Carr B, Goyal M, *et al*. Sepsis: the inflammatory foundation of pathophysiology and therapy[J]. Hosp Pract (Minneap), 2011, 39(3): 99-112.
[13] Zheng X, Yang D, Liu X, *et al*. Identification of a new anti-LPS agent, geniposide, from Gardenia jasminoides Ellis, and its ability of direct binding and neutralization of lipopolysaccharide *in vitro* and *in vivo*[J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10(10): 1209-1219.
[14] Fu J, Cao H, Wang N, *et al*. An anti-sepsis monomer, 2',5,6',7-tetrahydroxyflavanonol (THF), identified from Scutellaria baicalensis Georgi neutralizes lipopolysaccharide *in vitro* and *in vivo*[J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(12): 1652-1657.

(**收稿**:2011-12-29;**修回**:2012-02-03)
(编辑 张 维)

文章编号:1000-5404(2012)14-1437-01

个案与短篇

变应性鼻炎合并鼻腔解剖结构异常50例

杨东宝[1],梁小军[2],李丽萍[3] (408200 重庆,重庆市丰都县人民医院耳鼻咽喉科[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院耳鼻咽喉科[2];400020 重庆,解放军324医院麻醉科[3])

[**关键词**] 变应性鼻炎;鼻腔解剖结构;手术治疗
[**中图法分类号**] R765.21 [**文献标志码**] B

变应性鼻炎(allergic rhinitis,AR)是机体接触变应原后主要由IgE介导的鼻黏膜非感染性疾病。由于环境致病因素和机体自身免疫状况的复杂性和多变性,导致了鼻腔黏膜急性和慢性炎症的反复、交替和联合发生,增加了治疗难度[1]。2009年2月至2011年7月我科对50例合并鼻腔解剖结构异常的变应性鼻炎患者进行外科手术干预治疗,并进行随访,总体疗效满意,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

我科2009年2月至2011年7月收治的50例变应性鼻炎合并鼻腔解剖结构异常患者,行鼻腔外科手术干预治疗使其结构正常化,随访6~15个月,平均10个月。其中男性27例,女性23例;轻度患者17例,中-重度患者33例;年龄18~56岁,平均35.8岁;病程1.5~25年,平均12.5年;临床表现:喷嚏、清水样涕、鼻塞、鼻痒出现2项及以上。合并中下鼻甲肥大46例(92%),其中中鼻甲气化13例;合并鼻中隔偏曲38例(76%),合并钩突肥大或息肉样变23例(46%),下鼻甲内展11例(22%),其中大部分患者同时存在2种及以上解剖结构异常。

1.2 方法

本组50例患者均经鼻内镜行鼻腔外科手术干预治疗,手术采用局部麻醉,根据鼻腔解剖结构异常的部位,制定个体化的手术方案:合并中下鼻甲肥大或息肉样变者,在鼻内镜下行等离子中鼻甲、下鼻甲消融术或者下鼻甲部分切除术,中鼻甲骨气化或增生肥大者行黏膜下中鼻甲骨部分切除术,下鼻甲骨增生肥大者行下鼻甲骨黏膜下部分切除术,下鼻甲骨向鼻腔内侧突出导致鼻通气障碍者行下鼻甲骨骨折术(主要对下鼻甲骨后段骨折外展,以增加鼻腔空间,从而增加鼻吸气流量);合并鼻中隔偏曲者行鼻中隔矫正术;合并钩突肥大或息肉样变者行钩突切除术并清除的病变息肉样组织。本组中同时行中下鼻甲、钩突及鼻窦手术者为29例(58%),鼻中隔及中下鼻甲手术者15例(30%),中下鼻甲手术者6例(12%)。术后用膨胀止血海绵填塞术腔,48 h后取出膨胀止血海绵,术后常规鼻内镜术后换药,术后1周开始随访。

1.3 疗效评定

根据变应性鼻炎疗效评定标准。

1.3.1 症状评分标准 见表1。

[**通信作者**] 梁小军,E-mail:lj771477@qq.com

(下转1441页)